

⑫ 公表特許公報(A)

昭64-500083

⑬ 公表 昭和64年(1989)1月19日

⑭ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求	未請求	予備審査請求	未請求	部門(区分)	1(1)
C 12 P 21/00		D-6712-4B						
C 07 K 15/04								
C 12 N 5/00		B-8515-4B※						(全 13 頁)

⑯ 発明の名称 急性呼吸疾患に関連する独特のクラミジア株の検出

⑰ 特 願 昭62-502959

⑱ 翻訳文提出日 昭63(1988)1月4日

⑲ 出 願 昭62(1987)5月1日

⑳ 国際出願 PCT/US87/01011

㉑ 国際公開番号 WO87/06617

㉒ 国際公開日 昭62(1987)11月5日

優先権主張 ㉓ 1986年5月1日 ㉔ 米国(U S) ㉕ 858,380

⑳ 発 明 者 グレイストン, ジェイ., トー アメリカ合衆国, ワシントン 98105, シアトル, エヌ. イー.,  
マス フォーティナインス アベニュー3844

㉑ 発 明 者 クオ, チョ-チヨウ アメリカ合衆国, ワシントン 98115, シアトル, エヌ. イー.,  
ツウエンティナインス アベニュー-6531

㉒ 出 願 人 ワシントン リサーチ ファウ アメリカ合衆国, ワシントン 98105, シアトル, スート 322, エ  
ンデーション ス. イー. フォーティファイフス ストリート 1107

㉓ 代 理 人 弁理士 青木 朗 外3名

㉔ 指 定 国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特  
許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許)

最終頁に続く

特 許 要 求 書 (内容に変更なし)

特 許 要 求 の 範 囲

1. TWAR生物体の抗原決定基に対して向けられたモノクローナル抗体。

2. 急性呼吸疾患を引き起こすクラミジア株の抗原に結合するモノクローナル抗体。

3. 前記モノクローナル抗体が、前記抗原又は抗原決定基への、細胞系RR 402によって産生された抗体の結合を阻止する請求の範囲第1又は第2項記載のモノクローナル抗体。

4. TWAR生物体の抗原決定基に対して向けられたモノクローナル抗体を産生する連続したハイブリット細胞系。

5. 前記ハイブリッド細胞系がRR 402として同定されるハイブリッドマクロンを含んで成る請求の範囲第4項記載の細胞系。

6. 前記細胞系が、TWAR生物体に対する抗体を産生することができる免疫脾臓細胞と骨髓腫細胞とのハイブリットである請求の範囲第4項記載の細胞系。

7. 細胞系RR 402。

8. 請求の範囲第7項記載の細胞系によって産生されるモノクローナル抗体。

9. 生物学的サンプル中においてTWAR生物体の存在を検出するための方法であって：

請求の範囲第1～3項のいずれかのラベルされたモノクローナル抗体に、TWAR生物体を含むと思われる生物学的サンプルを暴露し；そして

前記モノクローナル抗体とTWAR生物体との間に形成される免疫複合体の存在を検出することを含んで成る方法。

10. 前記ラベルを、酵素、蛍光団、放射性同位体及び発光体から成る群から選択する請求の範囲第9項記載の方法。

11. 前記検出の段階が酵素反応、蛍光、発光放射及び放射能によって成る請求の範囲第9項記載の方法。

12. 前記生物学的サンプルを、体分泌液、体液及び組織検体から成る群から選択する特許請求の範囲第9項記載の方法。

13. 生物学的サンプル中においてTWAR生物体に対する抗体の存在を決定するための方法であって：

反応混合物を形成するために、TWAR生物体の基本体と共に生物学的サンプルをインキュベートし；そして

TWAR生物体に対する抗体の存在を決定するために前記反応混合物を分析することを含んで成る方法。

14. 前記分析段階が、抗体のためのラベルされた特異的結合パートナーと反応混合物とを接触し、そしてそのラベルを検出することを含んで成る請求の範囲第13項記載の方法。

15. 生物学的サンプル中においてTWAR生物体の存在を検出するための方法であって：

TWAR生物体が細胞内に取り込まれるように、HeLa細胞と共にTWAR生物体を含むと思われる生物学的サンプルを混合し；

TWAR生物体を含むHeLa細胞をインキュベートし；

TWAR生物体の抗原決定基に対して向けられた、ラベルされたモノクローナル抗体にHeLa細胞/TWAR株を暴露し；そしてTWAR生物体とラベルされたモノクローナル抗体との間に形

成される免疫複合体の存在を検出することを含んで成る方法。

16. 前記混合段階が、サンプルによりHeLa細胞を接種し、そして続いてHeLa細胞上でその接種されたサンプルを遠心分離することを含んで成る請求の範囲第15項記載の方法。

17. 前記暴露段階がメタノールにより単層を固定することを含む請求の範囲第15項記載の方法。

18. TWARを特異的に認識するDNAプローブ。

19. 活性治療物質として使用する請求の範囲第18項記載のDNAプローブ。

20. 前記DNAプローブが、TWAR生物体由来する完全な染色体DNAプローブ又はDNAフラグメントプローブである請求の範囲第18項記載のDNAプローブ。

21. 生物学的サンプルにおいてTWAR生物体の存在を検出するための方法であって：

サンプルに関連するDNAを単離するために、TWAR生物体を含むと思われる生物学的サンプルを処理し；

その単離されたDNAを基質に添加し；

TWAR生物体のDNA配列の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズすることができるラベルされたDNAプローブと共にそのDNA担持基質をインキュベートし；

その基質からハイブリダイズされなかったプローブを分離し；そして

前記基質に関連するラベルの量を検出し、そしてそれからTWAR生物体の存在又は不在かを決定することを含んで成る方法。

特許(特許)に変更なし)  
明 細 書

#### 急性呼吸疾患に関連する独特のクラミジア株 の検出

##### 技術分野

本発明は、一般的にクラミジア (*Chlamydia*) 株の検出及びより詳しくは、呼吸感染に関連する独特のクラミジア株の検出におけるモノクローナル抗体及びDNAプローブの使用に関する。

##### 背景の技術

クラミジアは、動物界を通して存在し、そして種々の疾病を引き起こすことが知られている偏性細胞内寄生体である。クラミジア属は、2種の認識される種、すなわちC. トラコマチス (*C. trachomatis*) 及びC. プシタシ (*C. psittaci*) 並びに3種のバイオバークのC. トラコマチスの派生を有する。C. トラコマチス、すなわち一次性ヒト病原体であるこの種は、目、呼吸及び尿生殖感染を引き起こす。C. トラコマチスは初めに、粘膜、たとえば結膜、鼻咽頭、直腸、尿道及び咽管上にコロニー形成することができ、この後、その感染は分散し、より深い器官系に影響を及ぼす。

クラミジアの他の種、すなわちC. プシタシは、ヒト呼吸疾患、すなわちオウム病の原因である。オウム病は、通常、感染された鳥類への接触によって感染し、オウム病の発生は、

22. 生物学的サンプルにおいてTWAR生物体の存在を検出するための方法であって：

TWAR生物体を含むと思われる生物学的サンプルを基質に添加し；

サンプルに関連するDNAを暴露するために、前記付着されたサンプルを担持する基質を処理し；

TWAR生物体のDNA配列の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズすることができるラベルされたDNAプローブと共に前記DNA担持基質をインキュベートし；

前記基質からハイブリダイズされなかったプローブを分離し；そして

その基質に関連するラベルの量を検出し、そしてそれからTWAR生物体の存在又は不在かを決定することを含んで成る方法。

シチメンチョウ及びカモに関連して、及びペットショップの客の間で起こる。その疾患はしばしば異型肺炎に類似し、そして軽いものから致命的なものまでの範囲を有する。そのような肺炎の流行病は通常、感染された鳥類に由来したが、鳥類のベクターは必ずしも見出されない。たとえば、1987年北フィンランドにおける放射線撮影法による調査の間、軽い肺炎の流行病が2つの集落に見出された。しかしながら、鳥類による伝染は見出されなかった。

血清疫学研究は、北ヨーロッパにおいてこの及びいくつかの他の肺炎流行病におけるクラミジアの通常の菌株を包含した。このクラミジアの新菌株は、つい最近、重要な呼吸病原菌として確立され、そしてそれは研究された成人集団におけるたぶん12%までの異型肺炎患者を引き起こした。しかしながらほとんどの感染は、原因物質がマイコプラズマ プネウモニアエ (*Mycoplasma pneumoniae*) 又はインフルエンザA型又はB型ウイルスであるまがった確信のために、抗生物質により不適切に治療された。M. プネウモニアエのために使用される少量でのエリスロマイシンによる抗生物質治療は、マイコプラズマ感染に対して効果的があるが、この投与量でのエリスロマイシンはクラミジア感染に対して効果的でない。さらに、これらの感染は、症状が明確に緩和した後、再発する疾病によってしばしば特徴づけられる。

新菌株のクラミジアと急性呼吸疾患とのこの関連の観点から、この新菌株の存在を診断するための正確且つ費用的に有効な方法を提供することがひじょうに所望され、それによ

て一次感染の有効な抗生物質治療を可能にするであろう。本発明は、そのような方法を提供し、そしてさらに他の関連する利点によって特徴づけられる。

#### 発明の開示

簡単に言えば、本発明は、生物学的サンプル中におけるクラミジアのTWAR生物体の存在を検出するための方法を提供する。これらの方法は、TWAR生物体の抗原決定基に対して向けられたモノクローナル抗体又はTWAR生物体に対して特異的なDNAプローブのいずれかを使用する。

本発明の1つの観点において、その方法は、(a) TWAR生物体の抗原決定基に対して向けられた、ラベルされたモノクローナル抗体に、そのTWAR生物体を含むと思われる生物学的サンプルを暴露する段階；及び(前記モノクローナル抗体と前記TWAR生物体との間に形成される免疫複合体の存在を検出する段階)を含んで成る。

TWAR生物体の存在を検出するための関連方法は、(a) TWAR生物体が細胞内に含まれるようにHeLa細胞とTWAR生物体を含むと思われる生物学的サンプルとを混合し；(b) 前記TWAR生物体を含むHeLa細胞をインキュベートし；(c) TWAR生物体の抗原決定基に対して向けられた、ラベルされたモノクローナル抗体に前記HeLa細胞/TWAR生物体を暴露し；そして(d) 前記TWAR生物体と前記ラベルされたモノクローナル抗体との間に形成される免疫複合体の存在を検出することを含んで成る。本発明の特に好ましい態様においては、前記混合段階は、サ

び中枢神経系液を含む。組織検体の例は、種々のバイオプシー、たとえば肺組織又はらっぱ管組織のバイオプシーを含む。さらに実質的にすべての部分からの組織（心臓組織及び肺組織）が、検死実験内で試験され得る。

本発明によれば、上記に記載された方法に使用するためにTWAR生物体の抗原決定基に対して向けられたモノクローナル抗体を産生する連続したハイブリッド細胞系が確立される。特に好ましい態様においては、その細胞系は、ハイブリドーマクローンRR 402又はIT 205を含んで成る。そのような細胞系により産出されるモノクローナル抗体もまた開示されている。

上記に示されるように、本発明はまた、TWAR生物体に対して特異的なDNAプローブも開示する。TWAR生物体のDNA配列の少なくとも一部を含むそのプローブが、生物学的サンプル中におけるTWAR生物体の存在を検出するための方法に使用され得る。

本発明の1つの観点において、その方法は、(a) サンプルに関連するDNAを単離するためにTWAR生物体を含むと思われる生物学的サンプルを処理する段階；(b) 基質にその単離されたDNAを添加する段階；(c) TWAR生物体のDNA配列の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズすることができるラベルされたDNAプローブと共にDNA担持基質をインキュベートする段階；(d) 前記基質からハイブリダイズしなかったプローブを分離する段階；及び(e) 前記基質に関連するラベルの量を検出し、そしてそれからTWAR生物体の存在又

は不在を決定する段階)を含んで成る。好ましい態様においては、前記分析段階は、抗体に対するラベルされた特異的な結合パートナーと前記反応混合物を接触せしめ、そしてそのラベルを検出することを含んで成る。これに関しては、その特異的な結合パートナーは、ヤギ抗-ヒトIgM又はヤギ抗-ヒトIgGである。

上記に簡単に記載された方法のすべてにおいて、モノクローナル抗体は、酵素、蛍光体、放射性同位体又は発光体によりラベルされ得る。これに関して、検出の段階は、通常、それぞれ酵素反応、蛍光、放射能又は発光によって存在するのである。

上記に説明された方法は、TWAR生物体又はそのTWAR生物体に対する抗体の存在を検出するために種々の生物学的サンプルに適用され得る。体分泌液、体液及び組織検体は適切なサンプルである。体分泌液の例は、頭管分泌液、気管-気管支分泌液、及び咽頭分泌液を含む。適切な体液は、血液、尿及

は不在を決定する段階)を含んで成る。好ましい態様においては、前記分析段階は、抗体に対するラベルされた特異的な結合パートナーと前記反応混合物を接触せしめ、そしてそのラベルを検出することを含んで成る。これに関しては、その特異的な結合パートナーは、ヤギ抗-ヒトIgM又はヤギ抗-ヒトIgGである。

は不在を決定する段階)を含んで成る。

本発明のもう1つの観点の範囲内の方法は、(a) 基質にTWAR生物体を含むと思われる生物学的サンプルを添加し；(b) 該サンプルに関連するDNAを暴露するために前記添加されたサンプルを担持する基質を処理し；(c) 前記TWAR生物体のDNA配列の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズすることができるラベルされたDNAプローブと共に前記DNA担持基質をインキュベートし；(d) 前記基質からハイブリダイズされなかったプローブを分離し、そして(e) 前記基質に関連するラベルの量を検出し、そしてそれからTWAR生物体の存在又は不在を決定することを含んで成る。

前記方法内のプローブは、完全な染色体DNAプローブ又はTWAR生物体由来したDNAフラグメントプローブである。

本発明のこれらの及び他の観点とは、次の詳細な説明及び添付図面によって明確になるであろう。

#### 図面の簡単な説明

第1A図は、C. アシタシの形態学的特徴のTWAR封入体を示す写真である。

第1B図は、C. トラコマチスの特徴的な空胞構造を示す写真である。

第2図は、TWAR単離体AR-39からのニックトランスレートされた完全な染色体DNAによりプローブされたC. トラコマチス、C. アシタシ及びTWARからの変性されたDNAの点のオートラジオグラフである。

第3A図は、THAR株AR-39 DNAの遺伝子バンクから単離された3.8kbpのPstIフラグメントによりプローブされた、MspIにより消化されたDNAのサザンハイブリダイゼーションのオートラジオグラフである。

第3B図は、THAR株AR-39 DNAの遺伝子バンクから単離された3.2kbpのPstIフラグメントによりプローブされた、HindIIIにより消化されたDNAのサザンハイブリダイゼーションのオートラジオグラフである。

第4図は、PstIにより消化されたTHAR DNAから成る遺伝子バンクから単離され、そして精製された3種のTHAR-特異性DNAプローブによりプローブされたTHAR、C、アシタシ及びC、トラコマチスからの変性された完全な染色体DNAの点のオートラジオグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

上記に示されるように、血清疫学研究は、北ヨーロッパ及び他の国においていくつかの肺炎流行病におけるクラミジアの通常の菌株を包含した。このクラミジアの新規菌株は、初めての2種の単離体の実験用名称 (TH-183及びAR-39) から "THAR" として本発明において言及される。THARは、クラミジア属に属することが示されているが、しかし、いくつかの基準によってC、トリコマチス及びC、アシタシから区別される。封入体の形態及び封入体におけるグリコーゲンの存在に関しては、THAR封入体は、グリコーゲンを含むC、トラコマチス封入体の空胞性質とは違って、それらの卵形且つ密

集した出現及びグリコーゲンの不在に基づいてC、アシタシにより密接に関連される。さらにTHAR生物体は、C、トラコマチス種-特異性モノクローナル抗体と反応しない(Stephens 等., J. Immunol. 128:1083, 1982)。

THAR生物体は明らかに、C、トリコマチス種に属さないが、それはまた現在認識されているC、アシタシ株とも重要な相違を示す。THAR及び他のC、アシタシ株は免疫学的に異なる。すなわち、他のC、アシタシ株との交叉反応は見出されていない。さらに、THAR生物体に対するモノクローナル抗体の産生において(下記により十分に記載されている)、C、アシタシ種-特異性抗体は検出されず、属-及び菌株-(THARセロバ) 特異性抗体のみが見出された。プラスミドは、試験されたほとんどすべてのC、アシタシ及びC、トラコマチスクラミジア株に見出されたが、THAR生物体はプラスミドを持たないことを注目することはまた興味の対象である。さらに、すべての既知のC、アシタシ株は動物又は鳥宿主を有するが、THAR生物体のための動物又は鳥宿主は見出されていない。本発明によれば、THAR生物体は、C、アシタシに形態的に類似するが、しかしそれとは異なり、そして現在認識されているC、アシタシ株とは免疫学的に異なるいくつかのクラミジア株を含むことが定義される。代表的なTHAR株 (AR-39) は、American Type Culture Collectionに寄託され、そして寄託番号第53592号を得た。

ハイブリドーマ形成及びモノクローナル抗体の産生は、種々の微生物疾患の免疫診断に有用であることが示された。よ

り詳しくは、モノクローナル抗体は、ヒト感染の検出及び血清学的な分類を可能にする。さらに、これらのモノクローナル抗体は、属-及び種-特異性抗原の同定を促進せしめる。

上記に示されたように、THAR生物体の抗原決定基に対するモノクローナル抗体を産生することができる連続したハイブリッド細胞系が確立される。そのような細胞系を確立するための一般的な方法は、実験動物、通常マウスを適切な抗原により免疫化することを含む。次に、免疫脾臓細胞を単離し、その化学物質、たとえばポリエチレングリコールに暴露することによって骨髓腫又はリンパ腫細胞と融合せしめる。次に、融合されたハイブリッド細胞を、悪性細胞系の増殖を妨げる選択培地、たとえばHAT培地中でインキュベートする。ハイブリドーマ細胞を限界希釈法によりクローンし、そして培養上清液を、所望の特異性を有するモノクローナル抗体の分泌のために検定する。選択されたモノクローナル抗体の多くの収量が、ハイブリドーマのインビボでの腹水増殖を通して得られた。

THAR生物体に対して特異的であるモノクローナル抗体を得るために、適切なTHAR抗原が調製されるべきである。患者の(のど)からのTHAR単離体を真核細胞培養又は胎児性卵黄の培養のいずれかを通して、培養することができる。ほとんどの一次単離物は、好結果をもたらす真核細胞培養の前、THAR生物体の卵順応性を必要とする。特に、THAR単離物を卵黄の培養物に1度又は2度通し、そして次にバイアル中に増殖されたHeLa 229細胞の培養物上にそれらを接種すること

が好ましい。そのHeLa細胞をDEAE-デキストラン及びシクロヘキサミドにより前処理することもまた好ましい。そのTHAR単離体は、くり返された培養物通過により細胞培養物中に増殖することが適合され得る。特に、約10又はそれよりも多くの一連の培養物通過がHeLa細胞増殖への適合のために好都合であろう。

第1A及び1B図を参照すれば、それぞれTHAR生物体及びC、トラコマチスにより感染されたHeLa 229細胞の単層を示す顕微鏡写真が、存在する。THARによる感染は、核を切り離さず又は置換していない比較的密集した細胞質封入体を示す。対照的に、第1B図は、核を切り離している、C、トラコマチスの典型的な空胞性封入を示す。

感染された細胞培養物は、通常、THAR生物体の感染度のためにモニターされ；そして数パーセントの細胞が感染される場合、多数のバイアル培養物は、大きな培養ボトル中での増殖のために調製物に接種される。好ましい態様においては、50%の感染度が得られる場合、20-30個のHeLa 229細胞のバイアルが、32-オンスの調剤ボトル培養物に植え込みを提供するために感染され得る。続く一連の経過は、THAR株クラミジアの数を高めるであろう。この適合及び拡大は、モノクローナル抗体の産生及びスクリーニングのためにTHAR抗原の十分な量を与えるであろう。

本発明に使用されるハイブリドーマ産生のための免疫原は、精製されたTHAR抗原であった。好ましい態様において、その抗原は、レノグラフィンにより精製されたTHAR基本体

(>99%に精製された)である。ハイブリドーマは、免疫マウス脾臓細胞とNS-O骨髓腫細胞との融合によって調製され、そして抗-クラミジア抗体を分泌するハイブリドーマクローンが同定される。好ましい状態においては、ハイブリドーマ培養上清液を、ELISAによってスクリーンする。特に好ましい状態においては、ELISAは、ペルオキシダーゼ接合性抗-マウス免疫グロブリン及び比色検出システムを使用する。マイクロイムノフルオレセンス法(S. P. Wang及びJ. T. Grayston, Amer. J. Ophthal. 70: 3678, 1970)によるモノクローナル抗体の特異性の試験がまた好ましい。

THARにより誘発されたハイブリドーマは、同系のBALB/cマウス中に腹腔内接種され得る。接種する前、2週間、マウスをプリスタンにより感作することが好ましい。その得られた腹水を収穫し、そしてモノクローナル抗体を精製することができる。好ましい状態においては、腹水性モノクローナル抗体を、プロテインA-セファロースカラム上でアフィニティー精製する。

選択されたTHARモノクローナル抗体を、本発明に記載された方法に使用するためにラベル化するさことができる。好ましいラベルは、酵素、蛍光体、放射性同位体及び発光体を含む。これらの及び他のラベルは当業界において良く知られている。これに関する特に好ましいラベルは、フルオレseinである。次に、そのラベルされたTHARモノクローナル抗体を、属一、種一及び株一特異性について試験することができる。第1表に示されるように、マイクロイムノフルオレセンス

アッセイに使用される場合、THARにより誘発されたモノクローナル抗体は、THAR単離体と反応したが、しかしC. トラコマチルまたはC. プシタシはそうではなかった。

# 第1表

## THARにより誘発されたモノクローナル抗体の特異性

クラミジア株	THARにより誘発されたMabに関するマイクロ-IP抗体力価	属一特異性Mabに関するELISA抗体力価
THAR-TM 183	6400	3200
AR 39	6400	3200
AR 277	6400	3200
AR 388	6400	3200
P. <u>プシタシ</u> (6株)	0	3200
<u>C. トラコマチル</u> (15株)	0	3200

フルオレsein接合性THARモノクローナル抗体は、感染された培養細胞中におけるTHAR基本体及びTHAR封入体の特異的に染色するが、しかし他のクラミジア株を染色しなかった。従って、本発明は、THAR特異性抗原決定基に結合するモノクローナル抗体を提供する。

本発明の範囲内で、THAR特異性モノクローナル抗体が、生物学的検体の診断アッセイに使用されて来た。特に、本発明は、臨床的検体のスミア及び接種された細胞培養物中におけるTHAR生物体を検出するための方法を提供する。これらの方法は、固定された検体におけるTHAR-特異性抗体決定基に直

接的に結合する、ラベルされたTHAR特異性モノクローナル抗体を使用する。その検体は、固体支持体、たとえばガラスライド、カバースリップ又はマイクロタイターウェル上に固定され得る。その検体又は生物学的サンプルはまた、メタノール又はエタノールにより、固体支持体に固定されるべきである。サンプルがその表面に固定又は結合された後、そのサンプルは、ラベルされたモノクローナル抗体に暴露される。他方、THAR特異性モノクローナル抗体に結合することができるラベルされた第二抗体が使用される。この方法の変法は、ラベルのシグナルの増強を提供することができる。直接的な蛍光抗体法によるスミア検体中のTHAR生物体の同定は、迅速であり、簡単であり、そして比較的安価である。そのスミア技法は、臨床的調整(初期診断、原因生物体の単離のための改良された機会、治療の成功に基づく追跡調査)及び表皮学的調整の両者に使用され得る。

THAR生物体の存在を検出するための方法を提供する他に、本発明は、生物学的サンプル中におけるTHAR生物体に対する抗体の存在を決定するための方法を提供する。THAR抗体のための血清又は体液のスクリーニングのための特に好ましい状態は、マイクロIDアッセイである。典型的には、抗原(クラミジア基本体抗原)を、顕微鏡のスライド上に固定し、そしてそのスライドを、THAR抗体を含むと思われるサンプルと共にインキュベートする。次に、ラベルされた特異的結合パートナー(たとえばフルオレsein接合性抗-マウス免疫グロブリン)を添加し、そしてその反応を、THAR生物体に対す

る抗体の存在を決定するために観察する。

DNAプローブの使用はまた、種々の微生物学的疾患の診断に有用であることが示されて来た。より詳しくは、DNAプローブを用いて、精製されたDNAを検出し、単離されたコロニー中の精製されていないDNAを検出し、又は組織、体液、食物及び水中のDNAを直接的に検出することができる。DNAプローブの使用の1つの利点は、その生物体が、臨界的な結合部位のマスキングを通して免疫学的検出を妨げることができる共存する抗体の存在において検出され得ることである。さらに、DNAプローブは、免疫蛍光法によって容易に検定され得ないサンプルに対して使用されるべく可能性を有する。いくつかの異なるアプローチ、特定の病原体に対して特異的なDNAプローブの開発に使用されて来た。これらのアプローチは、(a) 完全な染色体DNA；(b) その病原体に対してユニークなウィルス性機能に関連する配列；(c) プラスミドDNA；(d) リボソームRNA遺伝子；及び(e) 前記生物体に対して特異的な、クローンされたランダム配列を含む。

しかしながら、THARはプラスミドDNAを含まず、そしてウィルス性因子はこの生物体のために同定されていないので、本発明は、完全な染色体DNAプローブ及びTHAR生物体に対して特異的であるTHAR DNAの代表的なクローンされたフラグメントの両者を開示する。これらのプローブの使用は、C. トラコマチス及びC. プシタシとTHARとの区別を可能にする。

下記により詳細に説明されているように、DNAプローブは、THARのDNA配列とハイブリダイズするそれらの能力、及びC、トラコマチス及びC、アシタシからのDNAとのハイブリダイゼーションのそれらの欠失によって選択された。

簡単に言えば、完全な染色体DNAプローブに関しては、THARのDNAを、精製された基本体から単離し、ニックートランスレーションし、そしてドットブロットハイブリダイゼーションにおいてプローブとして使用した。第2図に示されるように、完全な染色体DNAプローブを用いて、C、トラコマチス及びC、アシタシからTHAR生物体を同定し、そして区別することができる。

手短かに言えば、DNAフラグメントプローブに関しては、THAR株を適切な生物学的サンプルから単離し、そしてそのDNAを精製した。制限エンドヌクレアーゼによる消化の後、DNAフラグメントの混合物を、アガロースゲル電気泳動によって分離した。次に、そのDNAフラグメントを、ブロットング又は電気泳動のいずれかによってニトロセルロース紙に移した。次に、ハイブリダイゼーションプローブを添加し、相同配列を検出した。より詳しくは、約500bp、900bp、1200bp、3200bp及び3800bpのサイズを有する、5種のクローンされたTHARのP<sub>u</sub>1 DNAフラグメントを、AR-39 DNAの遺伝子バンクから精製し、そして染色体消化物をプローブするために使用した。第3図に示されるように、それぞれの場合のハイブリダイジングフラグメントは、すべてのTHAR単離体に関して同じであった。さらに、活性は、C、トラコ

チス又はC、アシタシに関しては観察されなかったが、そのプローブは、THAR特異性であった。

臨床的な用途に使用するために、クローンされ、そして精製されたTHARフラグメントを、ドットブロットハイブリダイゼーションにおいてプローブとして使用することができる。第4図に示されるように、THAR、C、アシタシ及びC、トラコマチスの分解された基本体を試験する場合、前記フラグメントがTHARとのみ反応した。簡単に言えば、どちらかのタイプのプローブに関しては、感染物質を含むと思われる患者からの生物学的サンプルを破壊し、そのDNAを開放し、そしてそのDNAを、物理的(加熱)及び化学的(塩、界面活性剤)手段によってニトロセルロース上にスポットとして結合せしめる。ニトロセルロースに適用する前のサンプル調製の方法は、そのサンプル源に依存するであろう。すべての場合、そのニトロセルロースは、DNAの結合を高めるために1Mの酢酸アンモニウム中でブレインキュベートされる。多くのサンプルを処理し、そして濃縮するためには、それらのサンプルは、好ましくは、たとえばBioDot Micro-filtration装置の使用によってニトロセルロースに適用される。DNAが前に単離されている場合、サンプルは、0.3MのNaCl中で10分間、煮沸され、そして2Mの酢酸アンモニウムが添加される。1000Åのサンプルを、そのドットブロット装置に適用し、そして真空下で透過する。ウェルを2Mの酢酸アンモニウムにより洗浄し、そのウェルに結合している残留核酸を除去する。試験されるべきサンプルがEB

又は培養された細菌から成る場合、培養物を分解し、そして染色体DNAを0.5NのNaOH中で10分間、煮沸することによって変性し、HClの添加によって0.5NのHClの最終濃度中和し、そして6×SSCの最終濃度にする。臨床的な気道検体に関しては、サンプルをプロテイナーゼKにより処理し、SDSの添加によって溶解し、フェノールにより抽出し、RNase処理し、フェノールクロホルム抽出し、そしてエクソノール沈澱せしめる。次に、そのサンプルを上記のようにして煮沸することによって変性する。サンプル適用の後、そのフィルターを80℃で2時間、インキュベートし、2～4時間、ブレイブリダイズし、そして標準方法(Maniatisなど、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1983)によってハイブリダイズせしめる。

上記に簡単に記載された方法は、サンプル調製のために適切な方法の単に代表にすぎないことは、当業者にとって明らかであろう。本質的に、サンプル調製の目的は、そのサンプルに関連するDNAを生成し、そしてそのDNAを基質、たとえばニトロセルロースに、生成の前、又は後のいずれかで添加することである。これらの方法は、完全な染色体DNAプローブ又はDNAフラグメントプローブの両者を調整するために使用され得る。

患者のサンプルからの相補的DNAが存在する場合、ラベルされたハイブリダイゼーションプローブが結合されるであろう。そこで相補的DNAが存在しない場合、そのハイブリダイゼーションプローブは結合されず、そして容易に洗浄し、

除去され得る。非放射能プローブが使用される場合、そのハイブリダイゼーションプローブ上のラベルに対する基質が、測定されるべき反応のために必要であろう。ラベルが<sup>32</sup>Pである場合、その測定は、写真フィルムの現像を含む。ラベルが酵素の場合、その測定は、濃度計又は直接的な可視化のいずれかによって行なわれ得る。

選択されたDNAプローブの感受性を決定するために、前もって決定された濃度のTHARの種々の希釈溶液を前記のようにして破壊し、そして透過によりニトロセルロースに適用することができる。THARの粒子の計数は、コンゴレッドによるネガティブ染色法(Gerloffなど、J. Infect. Dis. 123: 429-432, 1971)によって、又は電子顕微鏡(Wangなど、Am. J. Ophthalm. 1443-1454, 1967)によって行なわれ得る。

完全な染色体DNAプローブよりも本発明に記載されたTHAR特異性フラグメントの1つの利点は、それらの純度である。細菌培養物のDNAによるクラミジルの染色体DNAの少々の汚染は、みずから非特異性バックグラウンド反応をもたらすであろう。この可能性ある問題を迂回するためには、完全な染色体DNAは、THARの増殖を十分に支持するMcCoy細胞又は他の非ヒト細胞系において増殖されるTHAR生物体から調製され得る。クローン化されたフラグメントの追加の利点は、完全な染色体DNAの単離のために多くの量のTHAR生物体を増殖するのと比べて、これらの特異的な配列の多くの量を単離する際、容易且つ安価であることである。DNAプローブの単離のために本発明に記載された方法の他に、

胎児性卵（6～8日目）の卵黄の中に接種した。ストレプトマイシンを、濃度が接種に基づいて卵当たり10mgに達するまで、その検体に添加した。それらの卵を、35℃でインキュベートし、そして毎日、明りに透かして調べた。死んだ後、又は12～13日間生存した後、卵黄のうを収穫し、そして Macchiavelli の染色法によって染色し、クラミジアの基本体について調べた。フルオレセインに接合されたTWARモノクローナル抗体が感染された卵黄のうを染色するために利用可能になる場合、そのTWAR生物体を、より一層容易に見ることが出来る。Macchiavelli染色によってこれまでも陰性であることができたいくつかの継代は、TWAR生物体を含むことが見出された。陽性培養物は普通、続く継代に基づいて多くの数の基本体を示した。

### C. 細胞培養中に増殖せしめるためのTHAR株の選合

そのようにして得られた13種の単離体うち1つを除く他のすべては、ほとんどのTHAR単離体をHeLa 229細胞培養バイアルにうまく適合せしめるために、細胞培養物の接種の前、生物体(1又は2世代)の卵適合物による、胎児性卵の卵質のうへの初めの接種を必要とした。

TMAR生物体の一連の継代を、Kuo など、("Nongonococcal Urethritis and Related Infections," 328~336 ページ 1977) の変法に従って、HeLa 229細胞のバイアル培養中で行なった。細胞培養物の単層について記載されているようにして(例1.A)、バイアル中の3種の別々のHeLa細胞単層を、それぞれの継代のために接種した。1つは固定化、そして

急性呼吸疾患を有する患者からの、トランスポート媒体（スクロース／カリウム／グルタマート；SPG）中のど（咽喉）の検体を、C. C. Huo など、(J. Infect. Dis. 125: 665 ~ 668, 1972)からの変法に従って培養した。それぞれの検体を、接種の前、DEAE-デキストラン (300 g / ml) 及びシクロヘキサミド (0.5 ~ 0.8 g / ml) により前処理された HeLa 229 細胞の単層を含む 3 個のバイアル上に接種した。その細胞上の接種物を、室温で 60 分間、2,200rpm で遠心分離した。次に、それらのバイアルを 35℃ で 72 時間インキュベートした（継代 1）。それらのバイアルの 1 つからの単層をメタノールにより固定し、そして蛍光抗体により染色し、感染を示す封入体について調べた。他の 2 個のバイアルは、継代 2 のための接種物を供給するために利用され得る。

急性呼吸疾患を有する患者からの、SPGトランスポート媒体中のど（咽頭）の検体を、J. T. Graystonなど、(Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103: 596, 1960)の方法に従って、

51 3

BALB/c マウスを、ホルマリンにより殺された  $5 \times 10^7$  個の THAR 生物体により、1 日目に腹腔内投与し、そして同様の接種物により 1 週間隔で、それから 3 又は 4 回静脈内投与することによって免疫化した。脾臓を、最後の免疫化の後、3 日目に収得した。

## 444 4

## 51 2

NS-O 骨髓腫細胞系を、融合工程に使用するために Milstein から得た。NS-O 細胞は通常、熱不活性化された 15% ウシ胎児血清、1 mM のグルタミン及び 1 mM のビルベートを含む RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, N.Y.) ("完全 RPMI") とし、て育てられる中で増殖された。

脾臓細胞懸濁液を、細かく切り、そして細かいナイロン製スクリーンを通してその細胞を通すことによって調製した。白血球細胞懸濁液を、血清を含まないRPHIにより3度洗浄し、NS-O細胞を血清を含まないRPHIにより1度洗浄した。

NS-O細胞及びリンパ球を、 $250\times G$ で10分間、遠心分離することによって、40%ポリエチレングリコール中で融合せしめた(1:4の割合又は1:8の割合で)。その細胞を完全RMPI10体積により洗浄し、そして $160\times G$ で5分間遠心分離した。その上清液をアスピレートし、そしてその細胞を、HAT培地により補充された完全RMPI(これは $1.0\times 10^{-4}M$ のヒポキサンチン、 $4.0\times 10^{-7}M$ のアミノブラ

リン及び  $1.6 \times 10^{-8} M$  のチミジンを含む) により  $2.5 \times 10^4$  個の細胞/μl に再懸濁した。このハイブリッド細胞懸濁液を、3～5週才のBALB/c マウスからの胸腺リンパ球と共に混合し、 $2.5 \times 10^4$  個の胸腺リンパ球/μl の最終濃度にした。その最終細胞懸濁液を、96-ウェル マイクロテスト プレート(Costar, Cambridge, Mass)のウェル中に接種した(2000μl 体積中)。HAT培地による追加の食餌(体積で50%の交換)を、5日及び8日目に与えた。連続した操作、食餌計画及び希釈を限定することによるクローニングを、Stephensなど(前記)によって記載されているようにして行なった。

#### 例 5

##### ハイブリッドマクロンのスクリーニング

培養液体中における抗-クラミジア抗体を、酵素結合された免疫吸着アッセイ(ELISA)によって検出した。抗体アッセイに関しては、リン酸緩衝液(PBS, pH7.6) 500μl における  $1 \times 10^4$  個のクラミジア生物体を、37℃で一晩インキュベートすることによってマイクロテストプレートの個々のプレートにより吸着せしめた。対照プレートをマイクロタイタープレートのウェルに感染されていないHeLa 229細胞( $10^4$  個の細胞/ウェル)を接種することによって調整した。次の朝、それらのプレートのウェルを、PBS中5%ウシ血清アルブミン(BSA) 750μlと共に2時間インキュベートすることによって非特異性タンパク質の吸着から阻止した。その抗体アッセイは次の3段階で行なわれた:

(1) 培養液体50μlを、37℃で60分間、抗原吸着ウ

ェルのそれぞれの中でインキュベートした。次に、結合させていない免疫グロブリンを、1%BSAを含むPBSにより3度、洗浄することによってウェルから除去した。

(2) ペルオキシダーゼ接合の抗-マウス免疫グロブリン(500μl)を、それぞれのウェルに添加し、そして37℃で60分間インキュベートした。残留する非結合性ペルオキシダーゼ接合体を、PBSにより3度、洗浄することによって除去した。

(3) その免疫反応を、基質にO-フェニレンジアミン及び $H_2O_2$ を添加することによって検出し、そして色素反応を定量化した。

ELISA によって陽性であることが示された培養上清液をマイクロ-IF技法で試験することによってさらに抗体特異性を、決定した(例6を参照のこと)。

#### 例 6

##### モノクローナル抗体の産生

同系BALB/c マウス中への  $1 \sim 5 \times 10^4$  個のハイブリッド細胞の腹腔内接種が、2～3週間内で触診できる腫瘍(ハイブリドーマ)を誘発した。腫瘍誘発を確かめるために、同系の宿主が、Priatane (2, 6, 10, 14-テトラメチルベンタデカン, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.) 0.5 mlの腹腔内接種によって2週間前に感作された。ほとんどの場合(>90%)、腹腔内に移植されたハイブリドーマの前増殖が、腹水(1.0～5.0 ml/マウス)の産生によって達成された。

その腹水中に含まれるモノクローナル抗体のアイソタイプを、モノクローナル抗体-スクリーンシステム(Zymed Laboratories, San Francisco, Calif.)を用いるELISA によって決定した。使用の前、腹水を、マイクロ-IF技法によって特定の抗体活性について試験した。

マイクロ-IFアッセイに関しては、培養液体又は腹水を、顕微鏡スライド上に置かれたクラミジア基本体抗原と湿潤室において、37℃で30分間、反応せしめた。反応の後、そのスライドをPBSにより5度洗浄し、そして空気乾燥せしめた。フルオレセイン接合の抗-マウス免疫グロブリンを添加し、そして湿潤室において37℃で30分間インキュベートした。インキュベートの後、そのスライドを蒸留水により5度洗浄せしめ、そして空気乾燥せしめた。FA封入抗体の一滴を添加し、そしてカバースリップをそのスライド上に置いた。その反応はFA-顕微鏡下で観察された。封入体の染色に関しては、感染されたHeLa細胞を黒水メタノール中において10分間、固定し、そしてIWAR特異性抗体活性について検定した。

腹水内に含まれるモノクローナル抗体を、プロテインA-セファロースカラム(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)上でアフィニティ精製した。フルオレセインイソチオシアネート接合のモノクローナル抗体を、Goding(J. Immunol. Meth. 13: 215, 1976)の方法によって調製し、そして直接的な免疫蛍光アッセイのための滴定により決定されるように、適切な希釈度で使用した。接合されなかったモノ

クローナル抗体を、間接的な免疫蛍光技法のために1:100の希釈度で通常使用した。

#### 例 7

##### 陰断アッセイ

##### A. 塗抹技法

C. 上ラコマチスに対するモノクローナル抗体を、臨床的な検体からのスミアの直接的な蛍光抗体(FA)アッセイのためにこれまで使用して来た。C. プシタシの菌株に対して特異的なフルオレセイン接合のモノクローナル抗体を、呼吸器検体の同様の直接的FAアッセイに使用して来た。簡単に、顕顕スワブを、2つの前もって印を付けられた円形の部分(直径5mm)上のガラススライド上でころがし、そして次に、そのスライドを95%エタノール中に10～30間、浸した。そのスライドを空気中で乾燥せしめた後、蛍光モノクローナル抗体接合体を、その検体部分に適用した。そのスライドを湿潤室で37℃で30分間インキュベートし、蒸留水を含む6個のジャーを通してすばやく浸し、そして乾燥せしめた。Bacto 蛍光抗体封入液体(Difco Laboratories, Detroit, Mich.)の一滴及びカバースリップを、そのスライドに適用し、次にエビフルオレセンス顕微鏡(Carl Zeiss, Oberkochen, West Germany)により油浸下で500倍で試験した。スミアの全部分を試験した。スライド上の調査結果は、少なくとも5個の蛍光性基本体が検体中に見出される場合、IWAR株に関しては陽性として考慮された。陰性の調査結果を有するスライドを、5分間読み取った。



THAR単離物を有する7人の患者のうち6人からの咽のスワブスミアーを、蛍光THARモノクローナル抗体により染色した。4人の患者において、クラミジアの典型的な基本体が示された。

#### B. 培養技法

フルオレセイン接合のTHAR株-特異性モノクローナル抗体を使用して、初期HeLa 229細胞培養継代におけるTHAR単離物を同定した。その細胞培養単離技法は、例1.A.に記載されている。THAR株-特異性モノクローナル抗体による直接的な蛍光抗体(FA)染色は、THAR単離物の同定をひじょうに促進せしめ、そしてこれらの単離物の直接的な継代を可能にした。THAR単離物のそれぞれは、封入体の直接的なFA染色によって一次HeLa 229細胞培養継代中に同定された。

#### C. 血清学的技法

正常な3%卵黄のうホモジネートと混合された(スライド上に抗原の局在化及び付着を助けるために)THAR抗原を、顕微鏡のスライド上に点在せしめ、空気乾燥せしめ、アセトンにより15分間、固定し、そして空気乾燥せしめた。連続した2倍希釈の血清又は体液(たとえば涙)を、抗原上に適用し、そして、30℃で30分間、湿潤室でインキュベートした。このアッセイ内で、その液は、クラミジア基本体抗原と反応された。反応の後、そのスライドをPBSにより5度洗浄し、そして空気乾燥せしめた。フルオレセイン接合の抗マウス免疫グロブリンを添加し、そして37℃で30分間、湿潤室でインキュベートせしめた。インキュベートの後、ス

ライドを蒸留水により5度洗浄し、そして空気乾燥せしめた。FA封入液体の一滴を添加し、そしてカバースリップをそのスライド上に置いた。その反応をFA-顕微鏡下で観察した。封入体の染色のためには、感染されたHeLa細胞を無水メタノール中において10分間固定し、そしてTHAR-特異性抗体活性についてアッセイした。

第2表は、世界の7つの異なる領域からの成人の血清中に存在する、高い頻度のTHAR抗体を示す。さらに、抗体は、女性よりも男性においてより頻りに存在することが見出された。

第 2 表				
	<u>デンマーク</u>	<u>ヘルシンキ</u>	<u>ノバスコチア</u>	
試験された数	555	271	200	
	%THAR抗体			
男 性	48	47	35	
女 性	41	36	18	
	<u>タイワン</u>	<u>日 本</u>	<u>パナマ</u>	<u>シアトル</u>
試験された数	64	196	934	1042
	%THAR抗体			
男 性	59	45	—	45
女 性	52	—	40	36

#### 例 8

THARのDNAの特徴化を通して、この例は、そのTHAR生物体が、C. トラコマチス及びC. プシタシと異なることを示す。

DNAを含まなかった(Weiss など、Infect. Immun. 2: 244~248, 1970)。

#### D. 制限エンドヌクレアーゼ分析及びハイブリダイゼーション:

使用される制限酵素は、BamHI, BstEI, DpnI, EcoRI, HindIII, MboI, MspI, PstI, SmaI, 及びSstIであった。すべての技法は、高い緊縮条件下で行なわれたハイブリダイゼーションによる標準法によって行なわれた

(Kingsburg, J. Bacteriol. 98: 1400~1401, 1969)。制限エンドヌクレアーゼ分析は、お互い及び2種のクラミジアの株とTHAR単離体との比較のために使用された。使用されるそれぞれの制限酵素により、THAR単離体は、トラホーム及びC. トラコマチスのLGVバイオバークから容易に識別され、そして5種の異なるC. プシタシの株が試験された。この方法の分析の範囲によれば、THAR単離体の結合パターンが、使用される酵素のうち8種と同一であった。

B. サザン ハイブリダイゼーション: THAR単離体の間の関係及び他のクラミジアとの関係をさらに調査するために、約500bp, 900bp, 1200bp, 3200bp及び3800bpのサイズの5種のランダムなTHARのDNAフラグメントを、AR-39のDNAの遺伝子バンクから精製し、そして染色体消化物をブロープするために使用した。第3図に示されるように、3.8 kbp(第3A図)のTHARフラグメント又は3.2 kbp(第3B図)のフラグメントが、それぞれMspI又はHindIIIにより消化されたクラミジアDNAのブロープとして使用される場合、それ

#### A. クラミジア株: 研究されたクラミジア株は、

- (1) THAR: TW-183, AR-39, AR-231, AR-277, AR-388, AR-427, AR-458及びLR-65(2, 3);
- (2) C. プシタシ: 68C, 骨髄肺炎(Mn), ネコ肺炎(FP), テンジクネズミ封入体結膜炎(GPIC)及び単液痘(OA), 及び
- (3) C. トラコマチス: B/TW-5/07, D/UW-3/Cx及びL2/434/Buを含んだ。すべてのTHAR株は、1985年シアトルから得られた咽頭単離体であった。但し、TW-183(これは、1965年タイワンの子供の結膜炎から単離された)を除く。すべてのクラミジア株は、HeLa 229細胞培養物中での増殖に適合され、そしてRenografinの直線グラジェントを通して精製された。

B. クラミジア DNAの単離: クラミジアのDNAを、C. トラコマチスのために前に記載したようにして単離した(Stephens など、Infect. Immun. 47: 713~718, 1985)。基本的には、精製された基本体を、37℃で1時間、プロテイナーゼK(640 g/ml)により処理し、そして1% SDS中に溶解した。フェノールによる抽出の後、水性層を37℃で30分間、RNase(500 g/ml)により処理し、フェノール/クロロホルムにより抽出し、そしてエタノールにより沈澱せしめた。

C. プラスミドのスクリーニング: 試験され8種のTHAR単離体は、アガロースゲル電気泳動によって決定される場合、それぞれ7.3及び6.2 kbpのプラスミドを含む。C. トラコマチス及びC. プシタシ対照と比べて、明確なプラスミド

その場合においてハイブリダイズするフラグメントは、すべてのTHAR単離体のために同じであった。さらに、反応性は試験されたC、トラコマチス又はC、プシタシに関して観察されなかったが、両プローブはTHAR特異性であった。同じ結果が他の3種のプローブに関して得られた。

F. プローブとして完全な染色体DNAを用いるドットプロットハイブリダイゼーションを用いてのDNA相同体の研究: C、トラコマチス及びC、プシタシに対するTHARの関係を決定するために、ドットプロット分析が、プローブとして完全な染色体DNAを用いて行なわれた。簡単に言えば、精製されたEBのDNA 0.2~50gを、0.3MのNaCl中で10分間煮沸した。続いて、2.0Mの酢酸アンモニウムを添加し、1000gの最終体積にした。サンプルを、Bio-Dot Microfiltration 装置 (Bio-Rad, Richmond, Calif.) の使用によってニトロセルロース (Trans-Blot, Bio-Rad, Richmond, Calif.) に適用した。濾過の前、そのニトロセルロースを、1Mの酢酸アンモニウム中で洗浄し、DNA付着を高めた。そのニトロセルロースを、前に記載したようにプレハイブリダイズする前及び後で、80℃で2時間、焼いた。ニックトランスレートされた完全な染色体クラミジア DNAを、煮沸し、そして続いて急速な冷却によって変性し、そしてこれらのハイブリダイゼーション実験においてプローブとして使用した。 %相同体を大まかに定量化するために、前記ニトロセルロースを、シンチレーション計数のために、Omni-fluor (Dunpont, Boston, Mass.) 中に懸濁された個々のドット

に切断した。

すべての実験において、ほとんどのクラミジア DNA調製物は少量のHeLaのDNA汚染物を含むけれどもHeLaのDNAを対照としてスポット化した。THAR株AR-39、C、トラコマチスセロバード及びC、プシタシ株6BC, PP, OA及びMoの完全な染色体DNAをニックトランスレートし、そして種々の単離物の変性された染色体DNAを含むドットプロットのプローブとして使用した。第2図に示されるように、2種のC、トラコマチスバイオバードも5種のC、プシタシ株のいずれも、AR-39プローブに対して有意な相同性を示さなかった。他方、すべてのTHAR単離体は、強いハイブリダイゼーションシグナルを示した。TW-183がプローブとして使用される場合、類似する結果が得られた。相反する実験がC、トラコマチス又はC、プシタシのDNAをプローブとして使用して行なわれる場合、バックグラウンド上の反応性が、いずれかのTHAR単離体により示された (データは示されていない)。

#### 例 9

THAR-特異性プローブを使用するアッセイ: 上記及び第2図及び第4図に示されるように、クローンされ、精製されたTHARフラグメントが、THAR、C、プシタシ及びC、トラコマチスの分解された基本体のドットプロットにおいてプローブとして使用される場合、試験された3種のフラグメント (900bp, 1200bp及び3200bp) は、THARとのみ反応した。

上記に示されるように、DNAプローブの感受性は、(a) 一本鎖のプローブの使用; 及び (b) リボソーム rRNA

遺伝子の単離を通して改良され得る。

#### 二本鎖のプローブの改良

二本鎖DNAプローブは、プローブの再アニーリングにより効率的にハイブリダイズしないので、ハイブリダイゼーションのために利用できるプローブの濃度は低められる。従って、ハイブリダイゼーションにおいて一本鎖のプローブを用いることによってプローブの感受性を高めることができる。この方法の主な制限は、十分に高い比活性へのその一本鎖のラベリングである。この問題は、DNAプローブの一本鎖挿入体を含む二本鎖ベクターをもたらし条件を用いることによって避けられ得る (Arrand, Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach 中の "Preparation of Nucleic Acid Probes", 17~45ページ, Oxford Press, Oxford, England, 1985)。pUCベクターにおけるTHAR遺伝子バンクの初期構造は、一本鎖のバクテリオファージM13mp18の複製型(RF)へのサブクロニングを促進する。なぜならば、これらのベクターは、同じ $\phi$ acZ' / 複製クロニング部位を共有するからである。M13<sup>+</sup> 偶数の $\phi$ ファージベクター (たとえば、M13mp18) が、pBB322由来の配列 (前記) にハイブリダイズするであろうラベルされたプローブの産生を妨げるために、寄数シリーズ (たとえば、M13mp18) の代わりに使用するために推薦される。この一本鎖DNAプローブは、Hu及びMessing (Gene 17: 271~277, 1983) の方法によって調製され得る。このプローブを放射性ラベルするために、市販されている一般のプローブプライマーを使用することができる。このプラ

イマーは、ベクターDNAの合成を指図し、そして制限された濃度の放射性前駆体の存在下において、そのプライマー付加部分は、一本鎖DNAプローブ挿入体を含む二本鎖ベクター (M13) をもたらし。M13mpバクテリオファージのRF型の単離、M13中へのpUCのサブクロニングのための組換え体のサブクロニング及びM13配列の選択的合成 (及びラベリング) のためのすべての方法は、Messing (Meth. Enzymol. 101: 20~79, 1983) によって記載されているようにして、標準方法によって行なわれ得る。このプローブがサザンハイブリダイゼーションに使用される場合、それはハイブリダイゼーションの前、変性されない。

#### リボソームRNA遺伝子の単離

DNAプローブの感受性を高めるためのもう1つの方法は、複製コピー配列を認識するDNAプローブを使用することである。リボソームRNAに対して特異的なクローン化されたDNAの使用は、細胞当りの目標分子 (リボソーム) の多くの数によって、1000倍まで検出を高めるための手段として記録されている (Edelstein, J. Clin. Microbiol. 22: 425 ~ 427, 1986; Kingsbury, Rapid Detection and Identification of Infectious Agents, 91~95ページ, Academic Press, N.Y., 1985; Palmer及びPalkow, Microbiology 1986, 91~95ページ, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1986)。1つのそのような方法が下記に説明される。

合計のRANが、16sのrRNAの単離のために、最適な時間での後接種の決定のために感染せしめた後、種々の時間

でTWAR培養物から単離される。rRNAは、Kirby(Kirkなど、Bioch. J. 104: 258~262, 1967; Johnson, Method in Microbiology 18: 33~71, 1986)の従法によって単離される。この方法は、DNA, mRNAを実質的に含まないが、しかしむしろ少量のtRNAを含む細菌性rRNAの単離をもたらす(Johnson, 前記)。RNaseを含まない緩衝液を得るために、ジエチルピロカーボネート(0.2%)を、1時間水溶液に添加し、そして続いてオートクレーブ処理する。ガラス器具は、乾燥加熱オープン中で焼くことによって、RNaseを含まないようにされ得る。精製された粒子を、遠心分離により収獲し、 $dB_2O$ 中に懸濁し、そして10%ナフタレンジスルホネード及び750 $\beta$ のジエチルピロカーボネートを添加する。フレンチプレスによって細胞をフェノール-クレゾール及び0.5%ナフタレンジスルホネートの混合物中に通すことによって、細胞を分解する。振った後、その混合物を、17,000 $\times G$ で10分間、遠心分離し、そして水性層を取り出す。20 $\times SSC$ 10 $m$ を添加し、そしてSDSを添加し、0.1%の最終濃度にし、続いてもう1つのフェノール-クレゾール抽出を行なう。RNAを、2体積のエタノールの添加により沈澱せしめ、そして遠心分離によりペレット化する。残留DNA, mRNA及びtRNAをさらに抽出するために、3Mの酢酸ナトリウムを添加し、その混合物を均質化し、遠心分離にかけ、そして再沈澱せしめる。5s, 16s及び23sのリボソームRNAが、Grierson(Gel Electrophoresis of Nucleic Acids, 1~139 ページ, IRL Press, Oxford,

1982)によって記載されているように、1.5%アガロースゲルから電気泳動により精製される。50 $mM$ のTris-HCl中で加熱することによって、RNAを軽いアルカリ加水分解にゆだね、そしてインキュベーションの時間及び温度はRNA種に依存して異なる(Malzeau, Cell 9: 431~438, 1976)。この加水分解段階は、ポリヌクレオチドキナーゼのための基質として5'ヒドロキシル基を利用するためにそれらの基を開放する。rRNAは、標準方法(Maniatis, 前記)によって、T4ポリヌクレオチドキナーゼによる $^{32}P$  ATPにより末端をラベル化される。おのおのの種は、種々の制限rRNA遺伝子により調整されたTWARのサザンハイブリダイゼーションのプロープとして使用され得る。なぜならばほとんどの細菌種は、rRNA配列の複数の遺伝子コピーを含むからである。クローン化されたTWARのrRNA遺伝子を、TWAR検出におけるそれらの感受性及びC. トラコマチス及びC. プシタシとのそれらの反応性のために試験する。サザンハイブリダイゼーションデーターに依存して、完全な遺伝子を含むと思われるいくつかの制限フラグメントがアガロースゲルから電気泳動され、そして同様にして消化されたpUC18中にクローン化され、又は前に構成された遺伝子バンクがプロープとして異なったrRNA種を用いてスクリーンされる。TWARの16s rRNA遺伝子を含むフラグメントサイズに依存して、その遺伝子は、両方向におけるDNA配列決定のために、M13mp18及びM13mp19中に直接的にサブクローンされるか、又は小さなフラグメントに消化され、そしてそれらにサブクローンさ

れる。すべてのDNA配列決定は、BRLからの市販されているキットを用いて、標準方法によるジデオキシヌクレオチド鎖ターミネーター法(Sangerなど、Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463~5467, 1977)によって行なわれ得る。クローン化されたTWARのrRNA遺伝子は、TWAR検出におけるそれらの感受性及びC. トラコマチス及びC. プシタシとのそれらの反応性について試験され得る。

本発明の特定の態様が例示する目的のためにここで記載されたけれども、種々の修飾が本発明の範囲内で行なわれ得る。



FIG.1

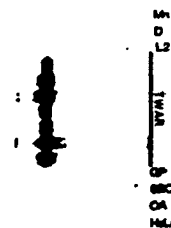


FIG.3A

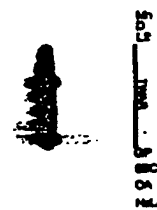
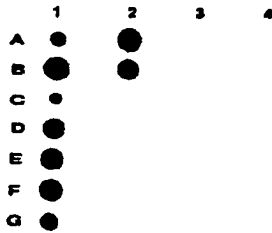


FIG.3B

FIG.2



昭和63年10月 14 日

特許庁長官 古田 文 毅 殿

## 1. 事件の表示

PCT/US87/01011

## 2. 発明の名称

急性呼吸疾患に関連する独特のクラミジア株の  
検出

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ワシントン リサーチ ファウンデーション

## 4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士 (8579) 青 木 朗 (外3名)

## 5. 補正命令の日付

昭和63年9月27日(発送日)

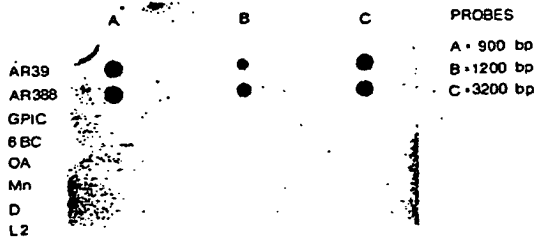


FIG.4

## 6. 補正の対象

(1) 特許法第184条の5第1項の規定による書面の「特許出願人の代表者」の欄

(2) 委任状

(3) 明細書及び請求の範囲の翻訳文

## 7. 補正の内容

(1)(2) 別紙の通り

(3) 明細書、請求の範囲の翻訳文の淨書(内容に変更なし)

## 8. 添付書類の目録

(1) 訂正した特許法第184条の5第1項の規定による書面 1通

(2) 委任状及びその翻訳文 各1通

(3) 明細書及び請求の範囲の翻訳文 各1通

## 国際調査報告

CLASSIFICATION BY SEARCH UNIT		PCT/US 87/01011	
IPC <sup>4</sup> C 12 P 21/00; C 12 M 15/00; G 01 N 33/569; C 12 Q 1/68			
C. FIELD SEARCHED			
Classification System 1		Classification System 2	
IPC <sup>4</sup> C 12 P; G 01 N			
Documents Examined (other than those mentioned in the Search Report)			
IN DOCUMENTS REFERRED TO AS RELEVANT <sup>5</sup>			
Category <sup>7</sup>	Character of Document <sup>8</sup> (if not mentioned, insert appropriate, of the relevant language)	Reference to Claim No. <sup>9</sup>	
Y	WO, A, 85/02685 (MERU, INC.) 20 June 1985 see pages 27-34, claims	1	
Y	WO, A, 86/02355 (TECHNOLOGY LICENCE CO. LTD) 24 April 1986 see pages 21-28, claims	1	
Y	GB, A, 2156074 (ORION-YHTYNA OY) 2 October 1985 see page 5, lines 53-64	18	
Y	EP, A, 0124124 (ENZO BIOCHEM) 7 November 1984 see page 6, line 25 - page 7, line 2	18	
-----			
<sup>1</sup> Special Categories of prior documents: <sup>2</sup> "A" documents referring to a general state of the art which is not known to be of particular interest. <sup>3</sup> "B" documents not published in a language in which the international search was conducted. <sup>4</sup> "C" documents which are known to be of particular interest to the applicant. <sup>5</sup> "D" documents which are known to be of particular interest to the applicant. <sup>6</sup> "E" documents which are known to be of particular interest to the applicant. <sup>7</sup> "F" documents which are known to be of particular interest to the applicant. <sup>8</sup> "G" documents which are known to be of particular interest to the applicant. <sup>9</sup> "H" documents which are known to be of particular interest to the applicant.			
IV. CERTIFICATION		Date of issuing of this International Search Report	
Done at the Patent Office of the International Bureau		20 JAN 1988	
14th December 1987			
EUROPEAN PATENT OFFICE		P.C.G. VAN DER PUTTEN	

International Search Report No. PCT/JP 87/21511

OTHER INFORMATION CONTAINED FROM THE SECOND SHEET

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE

The international search report has not been made available in respect of certain claims under Article 17(2) of the following reasons:

☐ Claim numbers ..... because they relate to subject matter not claimed in the priority document(s);

☐ Claim numbers ..... because they relate to claims of the international application that do not comply with the procedural requirements in respect of claims that an international search report can be carried out on;

☐ Claim numbers ..... because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a);

III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

The International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

- claims 1-17: Monoclonal antibody, cell line producing this antibody and use of this antibody
- claims 18-22: DNA probe and its uses

☐ As all requested additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all requested claims of the international application.

☐ As only some of the requested additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, separately stated:

☐ No requested additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims. It is directed to claim numbers:

☐ All of the requested claims could be searched without effect prejudicing an essential fee, the International Searching Authority did not search on priority.

☐ The applicant's search fees were accompanied by insufficient payment.

☐ No amount corresponding to the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (International Search Report) (23 January 1985)

This report is based on the international search report relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The numbers are as contained in the European Patent Office (EPO) file on 12/01/85. The European Patent Office (EPO) is in no way liable for those publications which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family (number(s))	Publication date
WO-A- 8502685	20-06-85	EP-A- 0168422 US-A- 4683196	22-01-86 28-07-87
WO-A- 8602355	24-04-86	EP-A- 0198001	22-10-86
GB-A- 2156074	02-10-85	BE-A- 901671 SE-A- 8500733 FR-A- 2553783 DE-A- 3505287 AU-A- 2842285 JP-A- 80188100 NL-A- 8500424 LU-A- 85768	29-05-85 18-08-85 23-08-85 05-09-85 22-08-85 25-09-85 18-09-85 24-07-85
EP-A- 0124124	07-11-84	AD-A- 2754684 JP-A- 60040956	08-11-84 04-03-85

For more details about this report, see (Official Journal of the European Patent Office, No. 12/85)

第1頁の続き

⑨Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 15/00  
C 12 Q 1/04  
1/68  
G 01 N 33/569  
33/577  
//C 12 P 21/00  
C 12 R 1:91  
C 12 N 5/00  
C 12 R 1:91

C-8412-4B  
6807-4B  
A-6807-4B  
7906-2G  
B-7906-2G

⑩発明者 ワン, サン・ビン

⑪発明者 キャンベル, リー, アン

アメリカ合衆国, ワシントン 98052, レッドモンド, エヌ. イー., ワンハンドレッドエイティセカンド アベニュー - 2050  
アメリカ合衆国, ワシントン 98155, シアトル, エヌ. イー., エイス アベニュー - 17515

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**